

DB32

江苏省地方标准

DB32/T 5099—2025

甘蓝类蔬菜黑斑病菌分子检测技术规程

Technical code of practice for molecular detection of
Alternaria brassicicola on cole vegetables

2025-03-25 发布

2025-04-25 实施

江苏省市场监督管理局 发布
中国标准出版社 出版

目 次

前言Ⅲ

1 范围1

2 规范性引用文件1

3 术语和定义1

4 缩略语1

5 原理1

6 试剂和材料2

7 仪器设备2

8 试验步骤2

9 结果判定3

附录A(资料性) 甘蓝类蔬菜黑斑病4

附录B(规范性) RPA产物电泳图.....5

前 言

本文件按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第 1 部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由江苏省园艺标准化技术委员会提出、归口并组织实施。

本文件起草单位：江苏省农业科学院、江苏省农业技术推广总站、江苏益禾农业科技有限公司。

本文件主要起草人：余方伟、曾晓萍、李建斌、夏冬健、王神云、张伟、杨伟国、周晗昕、黄鹍、王桂楼。

甘蓝类蔬菜黑斑病菌分子检测技术规程

1 范围

本文件规定了甘蓝类蔬菜黑斑病菌分子检测的原理、试剂和材料、仪器设备、试验步骤和结果判定。
本文件适用于甘蓝类蔬菜叶片、花茎、角果等部位黑斑病菌的分子检测。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中,注日期的引用文件,仅该日期对应的版本适用于本文件;不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法
SN/T 2965 植物病原真菌分子生物学检测规范

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

芸薹生链格孢 *Alternaria brassicicola*

引起甘蓝类蔬菜黑斑病的主要病原,属半知菌亚门,丝孢目,暗色菌科,链格孢属。

注:甘蓝类蔬菜黑斑病症状及病原菌形态特征见附录 A。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

DNA:脱氧核糖核酸(Deoxyribonucleic acid)

PCR:聚合酶链式反应(Polymerase chain reaction)

RPA:重组酶聚合酶扩增(Recombinase polymerase amplification)

Tris:三羟甲基氨基甲烷[Tris(hydroxymethyl)aminomethane]

TAE:三羟甲基氨基甲烷/乙酸/乙二胺四乙酸(Tris/acetic acid/ethylenediaminetetraacetic acid)

5 原理

重组酶聚合酶扩增是一种快速分子检测技术,主要依靠重组酶、单链结合蛋白和链置换 DNA 聚合酶,在特定恒温条件下实现对甘蓝类蔬菜黑斑病菌靶标序列的高效扩增。RPA 反应开始时,重组酶在三磷酸腺苷的参与下结合引物,形成重组酶-引物复合体。这些复合体能够扫描与引物序列互补的目标双链 DNA,然后侵入 5'端位点,随后单链结合蛋白与被置换单链结合使其稳定。最后链置换 DNA 聚合酶结合在核酸蛋白复合体的游离 3'端,进行链延伸。以上步骤循环进行,实现甘蓝类蔬菜黑斑病菌靶标序列的指数式扩增。

6 试剂和材料

- 6.1 水:实验室用水符合 GB/T 6682 的规定。
- 6.2 RPA 所用的引物序列见表 1。

表 1 引物序列

引物	序列(5'→3')
正向引物	CAGACATGAACACGCCAACATGACTAGACC
反向引物	GTGAGGCTTAGCGTAGAGTGTCAACGGTTC

- 6.3 液氮。
- 6.4 基因组 DNA 提取试剂盒。
- 6.5 RPA 试剂盒:包含 A 缓冲液、B 缓冲液和含有冻干粉剂的反应管。
- 6.6 DNA 抽提液:Tris 饱和酚、氯仿、异戊醇按体积比 25:24:1 混合。
- 6.7 50×TAE 缓冲液(pH 8.5)。
- 6.8 琼脂糖。
- 6.9 核酸染料。
- 6.10 DL2000 DNA marker。
- 6.11 微量移液器配套的带滤芯吸头。
- 6.12 离心管:1.5 mL。

7 仪器设备

- 7.1 电子天平:分度值为 0.001 g。
- 7.2 台式低温高速离心机:转速≥13 000 r/min,温度 4℃可控。
- 7.3 微量移液器:量程分别为 2.5 μL、10 μL、20 μL、100 μL 和 1 000 μL。
- 7.4 PCR 仪或恒温水浴锅。
- 7.5 4℃冰箱和-20℃冰箱。
- 7.6 水平电泳仪。
- 7.7 凝胶成像仪。

8 试验步骤

8.1 样品采集

样品保存于 4℃冰箱,保存期不超过 48 h。

8.2 样品处理

按照 SN/T 2965 的规定处理样品,处理后的样品置于液氮中充分研磨,称取约 100 mg 于 1.5 mL 离心管中,使用基因组 DNA 提取试剂盒提取基因组 DNA,保存于-20℃冰箱备用。

8.3 RPA 反应

以提取的样品基因组 DNA 为模板,采用 DNA 恒温快速扩增试剂盒进行 RPA 反应。同时设置以下对照:阳性对照中添加芸薹生链格孢基因组 DNA 作为模板;阴性对照中添加健康甘蓝类蔬菜叶片来源的基因组 DNA 作为模板;空白对照中添加灭菌超纯水作为模板。检测体系见表 2。

表 2 芸薹生链格孢 RPA 检测反应体系

组分	体积/ μL
A 缓冲液	29.4
正向引物(10 $\mu\text{mol/L}$)	2
反向引物(10 $\mu\text{mol/L}$)	2
模板	2
灭菌超纯水	12.1
B 缓冲液	2.5
总体积	50

依次向含有冻干粉剂的反应管中加入上述组分,充分混匀后置于 PCR 仪或恒温水浴锅中,38 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min。反应结束后加入等体积 DNA 抽提液,4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下以不低于 13 000 r/min 的转速离心 5 min,转移上清至新的离心管中。配制 1 $\times$ TAE 缓冲液和 1% 琼脂糖凝胶(每 50 mL 琼脂糖溶液中加入 5 μL 10 000 $\times$ 核酸染料),用微量移液器各吸取 5 μL DL2000 DNA marker 和 10 μL 上清点样,进行琼脂糖凝胶电泳检测。

9 结果判定

9.1 试验成立条件

试验成立应符合附录 B 的要求,即阳性对照出现目的条带,阴性对照和空白对照无目的条带;如阳性对照、阴性对照和空白对照任意一项不满足以上条件,此次试验视为无效。

9.2 试验结果判定

被检样品出现目的条带,判为检出芸薹生链格孢,否则判为未检出。

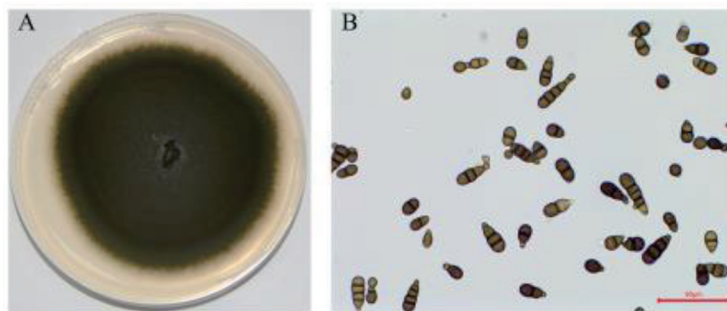
附 录 A
(资料性)
甘蓝类蔬菜黑斑病

A.1 甘蓝类蔬菜黑斑病症状

甘蓝类蔬菜的叶片、花茎和角果均能发病。该病多发生在外叶上,发病初期在叶面上产生黑色小斑点,直径3 mm~7 mm,同心轮纹不显著。温度高时,病斑迅速扩大为灰褐色圆形病斑,直径5 mm~30 mm,具明显的同心轮纹,并伴有黄色晕环,湿度大时病斑上产生黑色霉层。后期叶片上多个病斑汇合,有时中间穿孔或破裂。花茎、角果染病,则现出黑褐色长梭形条状斑,导致结实少或种子瘪瘪。

A.2 病菌生物学特性

芸薹生链格孢的菌落(见图 A.1)呈青褐色,气生菌丝少,易产生孢子。分生孢子梗单生或簇生,常见直立生长,少见屈膝状弯曲。分生孢子常串生,倒棍棒状,淡褐色至深褐色,具横隔膜1个~11个,纵、斜隔膜较少,喙不发达,孢子大小($20\ \mu\text{m}\sim 70\ \mu\text{m}$) $\times$ ($8\ \mu\text{m}\sim 20\ \mu\text{m}$)。



标引序号说明:

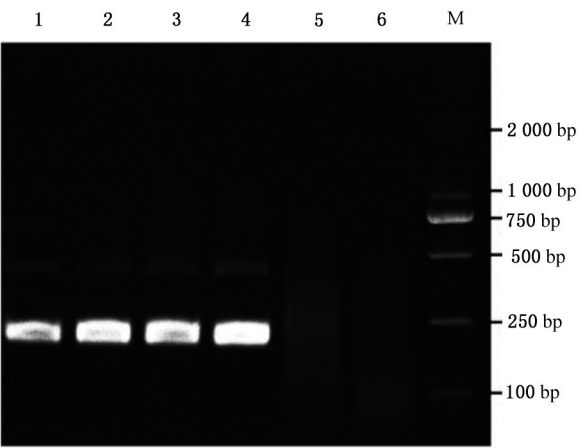
A——芸薹生链格孢的菌落形态;

B——芸薹生链格孢的孢子形态。

图 A.1 芸薹生链格孢菌落和孢子形态

附 录 B
(规范性)
RPA 产物电泳图

RPA 产物电泳结果如图 B.1 所示。



标引序号说明：
1~3 —— 阳性样品；
4 —— 阳性对照；
5 —— 阴性对照；
6 —— 空白对照；
M —— DL2000 DNA marker。

图 B.1 RPA 产物电泳结果